柞蚕感染微孢子虫后血淋巴免疫应答蛋白质的分离与鉴定

姜义仁[1,2,#], 宋　佳[2,#], 秦玉璘[3], 王　勇[1], 臧　敏[2], 钟　亮[2], 杨瑞生[2], 石生林[2], 段玉玺[1,*], 秦　利[2,*]

(1. 沈阳农业大学植物保护学院, 沈阳 110866; 2. 沈阳农业大学生物科学技术学院, 辽宁省昆虫资源工程技术研究中心, 沈阳 110866; 3. 沈阳药科大学生命科学与生物制药学院, 沈阳 110016)

摘要: 为了解柞蚕 *Antheraea pernyi* 感染微孢子虫初期血淋巴内免疫系统及刺激应答相关蛋白质种类, 本研究以柞蚕 5 龄雌幼虫的起蚕(结束 4 眠, 刚完成蜕皮的幼虫)添食柞蚕微孢子虫 *Nosema pernyi* 为材料, 对感染后血淋巴利用 SDS-PAGE 进行分离后, 利用 LC-MS/MS 质谱技术和蛋白质组学分析对差异蛋白质条带进行鉴定。结果显示: 感染微孢子虫 144 h 后, 血淋巴中分子量约为 44 kD (AP44) 和 28 kD (AP28) 的蛋白质条带表达量增高。质谱分析 AP28 和 AP44 蛋白质条带样品, 共鉴定 117 个不重复蛋白质, 其中 2 个样品共有蛋白质 12 个, AP28 独有蛋白质 52 个, AP44 独有蛋白质 53 个。对质谱数据利用 COG 数据库进行搜寻鉴定, 显示 AP28 和 AP44 的鉴定蛋白质中涉及柞蚕免疫系统及刺激应答生物过程的蛋白质共有 29 个, 其中 AP28 中包括热激蛋白、泛素样蛋白、泛素结合酶 E2、保幼激素环氧水解酶、微管结合蛋白、溶菌酶、ADP-核糖基化因子、防御蛋白、肽聚糖识别蛋白等 15 个, AP44 中包括 DRK、酚氧化酶原、类免疫球蛋白等 10 个; 二者共有热激蛋白 hsp21.4、酚氧化酶原、抗菌肽等 4 个。本研究结果可以为今后研究柞蚕对微孢子虫的免疫应答及防御机制提供参考。

关键词: 柞蚕; 柞蚕微孢子虫; 血淋巴; 免疫应答; 蛋白质; 蛋白质组学分析

中图分类号: Q965.8　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 0454-6296(2012)10-1119-13

Separation and identification of haemolymph proteins involved in immune response to *Nosema pernyi* infection in *Antheraea pernyi* (Lepidoptera: Saturniidae) larvae

JIANG Yi-Ren[1,2,#], SONG Jia[2,#], QIN Yu-Lin[3], WANG Yong[1], ZANG Min[2], ZHONG Liang[2], YANG Rui-Sheng[2], SHI Sheng-Lin[2], DUAN Yu-Xi[1,*], QIN Li[2,*] (1. College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China; 2. Liaoning Engineering & Technology Research Center for Insect Resources, College of Bioscience and Biotechnology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China; 3. School of Life Science & Biopharmaceutics, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: This study was aimed to preliminarily identify the proteins involved in the early immune response in the haemolymph from *Antheraea pernyi* larvae infected by *Nosema pernyi*. The 5th instar female larvae of *A. pernyi* were fed with *N. pernyi* spores and the proteins in the haemolymph were separated by SDS-PAGE, and the proteome profiles of the differential protein bands were further analyzed and identified by LC-MS/MS and proteomics analysis. One-dimensional SDS-PAGE analysis revealed that protein bands at 44 kD (AP44) and 28 kD (AP28) were enriched in the haemolymph of the female larvae at 144 h after feeding with the spores of *N. pernyi*. A total of 117 non-redundant proteins were identified by LC-MS/MS and searching the COG database, including 52 unique proteins from AP28, 53 unique proteins from AP44, and 12 proteins from both of them. Among them, 29 proteins are immune-related, including 15 proteins from AP28, such as heat shock proteins, ubiquitin-like proteins,

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-22); 辽宁省教育厅科研项目(L2010512); 沈阳市发改委科研项目(2011154); 沈阳农业大学校青年基金项目(201010002); 沈阳农业大学国家自然科学基金启动基金(20112002)

作者简介: 姜义仁, 男, 1982 年 12 月生, 黑龙江绥棱人, 博士研究生, 研究方向为有害生物与环境安全, E-mail: jiangyiren56@126.com; 宋佳, 女, 1989 年 2 月生, 辽宁盘锦人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫生物化学与分子生物学, E-mail: songjia0215@126.com

[#]共同第一作者 Authors with equal contribution

[*]通讯作者 Corresponding authors, Tel.: 024-88487163; E-mail: duanyx6407@163.com; qinli1963@163.com

收稿日期 Received: 2012-06-01; 接受日期 Accepted: 2012-09-18

ubiquitin-conjugating enzyme E2, juvenile hormone epoxide hydrolase, microtubule-associated protein RP/EB family member 3, lysozyme-like protein, ADP-ribosylation factor, putative defense protein and peptidoglycan recognition protein-like protein, and 10 proteins from AP44, such as DRK, prophenoloxidase and hemolin. Four proteins were identified from both AP28 and AP44, including heat shock protein hsp21.4, prophenoloxidase and basic attacin. The results provide the basis for further study on the mechanism of immune response and defense against *N. pernyi* infection in *A. pernyi*.

Key words: *Antheraea pernyi*; *Nosema pernyi*; haemolymph; immune response; protein; proteomics analysis

柞蚕 *Antheraea pernyi* Guérin-Méneville 属鳞翅目大蚕蛾科的泌丝昆虫，是中国特有的生物资源。我国年产柞蚕茧约 7×10^4 t，占世界野蚕丝总产量的90%以上。柞蚕微孢子虫病是由微孢子虫寄生柞蚕而引起的慢性传染病，是柞蚕的主要病害之一，在我国柞蚕产区均有分布，丝茧生产上的发病率在 30% ~ 70%，且严重影响柞蚕种质量（秦利，2003）。柞蚕微孢子虫 *Nosema pernyi* Ding, Su & Wen 是引起柞蚕微孢子虫病的主要病原物（丁杰等，1992）。柞蚕属开管式循环，血淋巴是柞蚕重要的组成部分，是体内各组织、器官交换物质的媒介，承担着许多重要的功能，血淋巴中的蛋白质有很多种，分别来源于各种不同的组织与细胞，这些蛋白质参与机体的凝血、免疫、小分子物质（包括激素等）运输、营养等一系列生理或病理过程。

蛋白相邻类聚簇（clusters of orthologous groups, COG）数据库是对蛋白质进行直系同源分类的数据库（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/）。而基因本体（gene ontology, GO）是一个国际标准化的基因功能分类体系，提供了一套动态更新的标准词汇表（controlled vocabulary）来全面描述生物体中基因和基因产物的属性。GO 总共有 3 个本体（ontology），分别描述基因的细胞组分（cellular component）、分子功能（molecular function）、参与的生物过程（biological process）（http://www.geneontology.org）。因此，采用上述 2 种分析能够为进一步分析蛋白质功能及其参与的生物学过程等提供参考。

本实验室研究发现，柞蚕微孢子虫侵染会引起柞蚕幼虫血淋巴蛋白质的含量及组成发生一定的变化，添食柞蚕微孢子虫 96 h 及 144 h 后，分别出现了分子质量约 44 kD 及 28 kD 的蛋白质含量增加的现象（臧敏等，2012）。这是否是由于微孢子虫寄生后柞蚕产生防御反应的结果尚不清楚。关于微孢子虫侵染而引起宿主的免疫应答研究在其他昆虫上已有报道（周婷等，2004；陈洪松和鲁兴萌，2010；Dussaubat *et al.*, 2012），但在柞蚕方面尚未见报道，本文利用 LC-MS/MS 质谱技术和蛋白质组学分析对我们研究发现的柞蚕感染微孢子虫后血淋巴产生的差异蛋白质条带进行鉴定，为研究柞蚕感染微孢子虫后的免疫响应机制提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试昆虫：健康柞蚕 5 龄雌幼虫起蚕（结束 4 眠，刚完成蜕皮的幼虫），品种为选大 1 号，由沈阳农业大学柞蚕研究所提供。

1.1.2 供试柞蚕微孢子虫：本研究所保存的柞蚕微孢子虫孢子悬浊液（4×10^8 个/mL），分离纯化参照姜义仁等（2011）方法进行。取柞蚕 5 龄雌幼虫起蚕若干头，添食组（NP）利用 Eppendorf 移液器（10 μL）经口添食柞蚕微孢子虫，剂量为 10 μL/头，对照组（CK）添食等剂量的 7.0 g/L NaCl 溶液，在温度 25℃，相对湿度 75% 条件下，以新鲜柞叶室内饲养。添食处理后从 0 h 开始每隔 24 h 取样 1 次，共取 10 次。在冰浴条件下剪破腹足取血，样品置 -20℃ 冰箱中保存备用。

1.2 血淋巴蛋白质 SDS-PAGE 分析

SDS-PAGE 电泳参照王勇等（2011）方法。采用 5% 浓缩胶和 12% 分离胶，样品与含有 β-巯基乙醇的上样缓冲液以 1∶1 体积比混合，每孔上样量 10 μL，采用 8 mA 电流电泳，待蛋白质带进入分离胶时改用 12 mA 电流电泳，至距凝胶下端 1 cm 处停止电泳，凝胶用考马斯亮蓝 R-250 染色 2 h，脱色后采用凝胶成像系统（Bio-Rad 公司）照相。

1.3 蛋白质胶内酶解及肽段提取

选取微孢子虫侵染柞蚕后出现的差异蛋白条带，用洁净的刀片切下，参照 Shevchenko 等（1996）的方法将切下蛋白条带分别进行胶内酶解，并洗脱，得到肽段混合物，具体方法：（1）蛋白质胶内酶解：胶条首先用含 50% 乙腈的 500 μL 的 25 mmol/L 的碳酸氢铵洗脱，弃去上清，重复 2 次，每

次 60 min；用 500 μL H_2O 洗脱 1 次，弃去上清；加入 500 μL 的乙腈脱水；56℃条件下使用 10 mmol/L DTT 处理 1 h，还原打开二硫键；在暗室使用 55 mmol/L IAM 处理 45 min，进行半胱氨酸的烷基化封闭；用胰蛋白酶溶液（10 ng/μL 溶于 25 mmol/L 碳酸氢铵溶液中）覆盖；冰上 30 min，去除多余酶液，加入 25 μL 25 mmol/L 碳酸氢铵，37℃消化过夜；加 5% 甲酸（FA）终止反应。(2) 肽段提取：使用含有 0.1% 甲酸的 50% 乙腈 200 μL 提取 1 次；使用含有 0.1% 甲酸的 100% 乙腈 200 μL 提取 2 次；收集所有的上清，并真空干燥，得到肽段混合物。

1.4　蛋白质条带基于 LTQ-Orbitrap CID 的 LC-MS/MS 分析

将抽干的每个组分分别用 buffer A（2% ACN，0.1% FA）复溶至约 0.5 μg/μL 的浓度，20 000 g 离心 10 min，除去不溶物质。每个组分上样 10 μL（约 5 μg 蛋白），通过岛津公司 LC-20AD 高效液相色谱仪进行反相分离，所用的反相柱为 C18 柱，包括两部分：长度 2 cm 内径 200 μm 的进样部分和长度 10 cm 内径 75 μm 的洗提分离部分。分离程序：先以 15 μL/min 的流速进样 4 min；然后以 400 nL/min 的流速梯度洗涤 44 min，洗涤梯度为 buffer B（98% ACN，0.1% FA）从 2% 上升到 35%；再从 35% 到 80% 线性洗提 2 min。最后用 80% 的 buffer B 洗柱 4 min，buffer A 洗柱 1 min。

经过液相分离的肽段进入到串联 ESI 质谱仪：LTQ Orbitrap Velos（Thermo Fisher Scientific）。机器分辨率设置为 60 000（质荷比/半峰宽）。用碰撞能量为 35% 的 CID（collision induced dissociation）模式对肽段进行筛选，在离子阱中检测信号。每个峰强度超过 5 000 的一级母离子打 8 个二级谱图。动态排除设定为：30 s 内出现两次的母离子在未来120 s 不再打二级。离子源电压设置为 1.5 kV。自动增益控制技术（automatic gain control，AGC）设置为：对离子阱内控制聚集量约 1×10^4 个离子进行扫描鉴定，扫描的质荷比范围为 350 ~ 2 000 Da。

1.5　质谱数据的蛋白质数据库搜寻鉴定

质谱采集到的原始数据先采用 Mascot 软件在 NCBI 数据库进行搜索和匹配，本次鉴定选用数据库为蚕蛾总科 Bombycoidea_txid37569 All entries（22 453 条序列）（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/?term=txid37569[Organism:exp]）。同时，在搜索过程中设定参数：首先，根据试验和仪器的情况，选择对应的酶、仪器类型以及一二级离子的质量容差，然后选择一些常用的固定修饰和可能发生的修饰，本次搜索选用的酶为胰蛋白酶，搜索选用的仪器为 LTQ-Orbitrap-Velos（Perkins *et al*., 1999）。

1.6　鉴定蛋白的功能注释

对鉴定蛋白进行 COG 注释及 GO 分析。将鉴定到的蛋白与 NCBI 的 COG 数据库（Eugene, 2002）进行比对，预测这些蛋白质可能的功能并对其进行功能分类统计。根据鉴定蛋白质的注释信息，用 Blast2GO 软件（Conesa *et al*., 2005）得到鉴定蛋白质的 GO 注释信息，再用 WEGO 软件（Ye *et al*., 2006）对所有鉴定蛋白质做 GO 功能分类统计。

2　结果与分析

2.1　柞蚕微孢子虫侵染柞蚕后血淋巴蛋白质的 SDS-PAGE 分析

柞蚕 5 龄雌幼虫起蚕感染微孢子虫 144 h 后血淋巴蛋白质 SDS-PAGE 结果见图 1，在添食组出现分子量约为 44 kD 及 28 kD 的蛋白质条带染色比对照组加深的趋势，表明柞蚕 5 龄雌幼虫血淋巴中这 2 条蛋白质条带在感染微孢子虫后表达量增高。

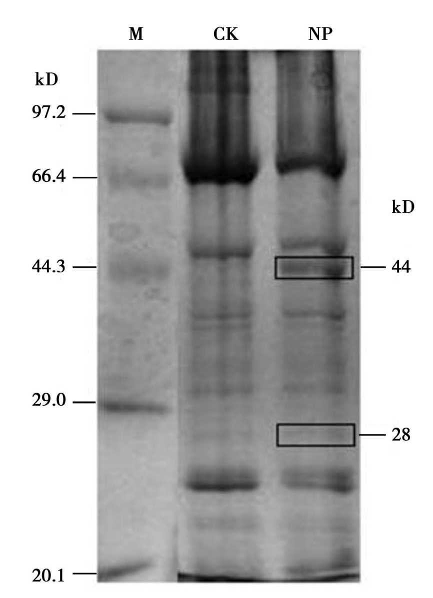


图 1　添食柞蚕微孢子虫 144 h 后柞蚕 5 龄雌蚕血淋巴蛋白质 SDS-PAGE 图谱

Fig. 1　SDS-PAGE on proteins from haemolymph of the 5th instar female larvae of *Antheraea pernyi* at 144 h post-feeding with spores of *Nosema pernyi*

M：蛋白分子质量标准 Protein marker；NP：添食微孢子虫的幼虫血淋巴 The haemolymph of the 5th instar larvae；CK：与 NP 相应的对照组幼虫血淋巴 The corresponding control.

续表 2 Table 2 contiuned

样品 Sample	登录号 Protein ID	蛋白质 Protein	物种 Species	等电点 Isoelectric point	分子量(kD) Protein mass	覆盖度 Coverage
	gi|46358051	Heat shock protein	天蚕 *A. yamamai*	4.83	82.65	0.0432
	gi|268306458	Ribosomal protein L27	烟草天蛾 *Manduca sexta*	11.33	15.88	0.2239
	gi|48958395	Ribosomal protein S18	天蚕 *A. yamamai*	11.08	17.79	0.1118
	gi|113208236	Peptidoglycan recognition protein A	蓖麻蚕 *Samia cynthia ricini*	7.92	22.22	0.0984
	gi|110347815	Peptidoglycan recognition protein-like protein	印度柞蚕 *A. mylitta*	8.13	22.42	0.0674
	gi|187234889	Elongation factor-1 alpha, partial	*Cechenena helops*	8.90	45.02	0.0196
	gi|229485336	RecName: Full = Putative defense protein 2; Short = DFP-2; Flags: Precursor	印度柞蚕 *A. mylitta*	6.96	17.39	0.0745
	gi|54633289	Ubiquitin-like protein	天蚕 *A. yamamai*	5.12	10.35	0.1319
	gi|87248487	Microtubule-associated protein RP/EB family member 3	家蚕 *B. mori*	5.43	30.75	0.0440
	gi|95102558	GTP binding protein	家蚕 *B. mori*	7.56	44.73	0.0378
	gi|54609191	Ribosomal protein P2	家蚕 *B. mori*	4.37	11.53	0.1161
	gi|51863357	Ribosomal protein S23	家蚕 *B. mori*	11.31	16.10	0.0769
	gi|5747	Unnamed protein product	家蚕 *B. mori*	5.16	42.25	0.0426
	gi|9967442	Ribosomal protein 49	家蚕 *B. mori*	12.11	9.00	0.1918
	gi|46394422	Ribosomal protein S24	家蚕 *B. mori*	11.59	15.22	0.1136
	gi|95102666	Transgelin	家蚕 *B. mori*	8.47	21.05	0.0957
	gi|54609255	Ribosomal protein L31	家蚕 *B. mori*	11.37	14.30	0.1129
	gi|110175082	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 1	家蚕 *B. mori*	4.58	28.01	0.0415
	gi|54609261	Ribosomal protein L35	家蚕 *B. mori*	11.47	14.51	0.1057
	gi|259493819	Hemocyte aggregation inhibitor protein precursor	烟草天蛾 *M. sexta*	7.59	48.40	0.0253
	gi|268306442	Ribosomal protein L27A	烟草天蛾 *M. sexta*	11.22	16.61	0.1081
	gi|95102644	Nascent polypeptide associated complex protein alpha subunit	家蚕 *B. mori*	4.38	22.66	0.0711
	gi|68066547	Transferrin	家蚕 *B. mori*	7.21	77.16	0.0323
	gi|95102728	Ubiquitin conjugating enzyme E2	家蚕 *B. mori*	6.54	17.26	0.1325
	gi|95103090	Thymosin isoform 1	家蚕 *B. mori*	4.69	19.18	0.0765
	gi|51863346	Ribosomal protein S14	家蚕 *B. mori*	11.32	16.15	0.0861
	gi|54609317	Ribosomal protein S16	家蚕 *B. mori*	10.68	17.22	0.0662
	gi|54609307	Ribosomal protein S12	家蚕 *B. mori*	6.10	15.37	0.0935
	gi|145286562	Lysozyme-like protein 1	印度柞蚕 *A. mylitta*	10.27	21.33	0.0447
	gi|54609325	Ribosomal protein S20	家蚕 *B. mori*	10.91	13.84	0.0976
	gi|194346224	TPA: laccase-like multicopper oxidase 2 isoform B	家蚕 *B. mori*	7.39	85.90	0.0144
	gi|187234491	Carbamoylphosphate synthetase/aspartate transcarbamylase/dihydroorotase, partial	木薯天蛾 *Erinnyis ello*	6.28	109.46	0.0133
	gi|95102936	Actin related protein 2/3 complex subunit 4	家蚕 *B. mori*	9.42	19.93	0.0655
	gi|1276940	Juvenile hormone epoxide hydrolase	烟草天蛾 *M. sexta*	6.96	52.75	0.0130
	gi|70908362	Eukaryotic initiation factor 5A	家蚕 *B. mori*	5.04	17.86	0.0750
	gi|157889130	Sericin 3	家蚕 *B. mori*	5.71	123.51	0.0110

续表 2 Table 2 contiuned

样品 Sample	登录号 Protein ID	蛋白质 Protein	物种 Species	等电点 Isoelectric point	分子量(kD) Protein mass	覆盖度 Coverage
AP28	gi|2613141	Beta-1 tubulin	烟草天蛾 *M. sexta*	4.49	50.65	0.0738
&	gi|30841715	Arylphorin precursor	柞蚕 *A. pernyi*	6.22	83.63	0.2457
AP44	gi|171262282	Attacin-like protein	柞蚕 *A. pernyi*	8.72	25.55	0.1217
	gi|62001779	Basic attacin	柞蚕 *A. pernyi*	7.90	25.34	0.1330
	gi|56378321	Heat shock protein hsp21.4	家蚕 *B. mori*	6.04	21.39	0.1711
	gi|25992174	Masquerade-like serine proteinase homolog	家蚕 *B. mori*	4.73	46.76	0.0286
	gi|253946990	Elongation factor-1 alpha	*Hyles calida*	7.06	27.14	0.0968
	gi|95103130	Abnormal wing disc-like protein	家蚕 *B. mori*	7.52	17.36	0.0779
	gi|110347821	Serpin-like protein	印度柞蚕 *A. mylitta*	7.34	22.76	0.0448
	gi|136206	RecName: Full = Transferrin; Flags: Precursor	烟草天蛾 *M. sexta*	7.29	76.60	0.0162
	gi|159526	Methionine-rich storage protein 1	烟草天蛾 *M. sexta*	8.78	88.78	0.0226
	gi|994751	Prophenoloxidase subunit 2	家蚕 *B. mori*	5.76	80.58	0.0231
AP44	gi|268306412	Ribosomal protein S8	*M. sexta*	11.28	23.93	0.3413
	gi|284944259	Glutathione S-transferase sigma	柞蚕 *A. pernyi*	5.03	23.72	0.3284
	gi|10716809	Vitellogenin	柞蚕 *A. pernyi*	7.73	202.22	0.0388
	gi|47457941	60S ribosomal protein L13	天蚕 *A. yamamai*	11.99	25.22	0.2081
	gi|46488004	Hemolin	柞蚕 *A. pernyi*	6.77	45.89	0.1138
	gi|87248207	Proteasome zeta subunit	家蚕 *B. mori*	4.71	27.09	0.1728
	gi|527680	Ribosomal protein S3	烟草天蛾 *M. sexta*	10.18	26.94	0.1440
	gi|87248255	Tyrosine 3-monooxygenase protein zeta polypeptide	家蚕 *B. mori*	4.63	28.27	0.1255
	gi|95102978	Proteasome subunit alpha type 6-A	家蚕 *B. mori*	6.90	27.47	0.1301
	gi|157813102	Putative triosephosphate isomerase	*Antheraea paukstadtorum*	4.84	16.28	0.1689
	gi|95102688	Eukaryotic translation initiation factor 6	家蚕 *B. mori*	4.44	26.61	0.1306
	gi|19773422	Alpha-tubulin	家蚕 *B. mori*	4.73	50.73	0.0644
	gi|312597590	Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase CG4265	家蚕 *B. mori*	4.77	25.51	0.0957
	gi|56462206	Ribosomal protein L1	罗奴霉素毛虫 *L. obliqua*	10.39	24.82	0.0602
	gi|56462300	Putative serine protease-like protein 2	罗奴霉素毛虫 *L. obliqua*	6.04	32.41	0.0786
	gi|95102790	Carboxylesterase	家蚕 *B. mori*	7.21	75.07	0.0275
	gi|217276	Elongation factor 1 beta	家蚕 *B. mori*	4.24	24.59	0.1216
	gi|95103034	Hydroxypyruvate isomerase	家蚕 *B. mori*	6.52	29.25	0.0731
	gi|229597913	Chain A, crystal structure of *Antheraea pernyi* arylphorin	柞蚕 *A. pernyi*	5.95	80.48	0.0341
	gi|2688890	Elongation factor-1 alpha	乌桕大蚕蛾 *Attacus atlas*	8.72	45.51	0.0291
	gi|2073101	Unnamed protein product	家蚕 *B. mori*	4.60	50.68	0.0380
	gi|857370	Prophenoloxidase	烟草天蛾 *M. sexta*	5.88	80.47	0.0230
	gi|95102980	Proteasome beta 3 subunit	家蚕 *B. mori*	4.74	23.33	0.0683
	gi|300669735	Loquacious	家蚕 *B. mori*	9.49	42.73	0.0314

续表 2 Table 2 contiuned

样品 Sample	登录号 Protein ID	蛋白质 Protein	物种 Species	等电点 Isoelectric point	分子量(kD) Protein mass	覆盖度 Coverage
	gi|87248109	Enoyl-CoA hydratase precursor 1	家蚕 *B. mori*	8.44	32.12	0.0642
	gi|54609225	Ribosomal protein L17	家蚕 *B. mori*	11.01	21.93	0.0535
	gi|87248273	Beta-tubulin	家蚕 *B. mori*	4.58	50.89	0.0314
	gi|17298117	Ribosome-associated protein P40	家蚕 *B. mori*	5.88	35.19	0.0481
	gi|87248657	Glucose-6-phosphate isomerase	家蚕 *B. mori*	6.94	62.06	0.0234
	gi|14028769	Chymotrypsin inhibitor CI-8A	家蚕 *B. mori*	5.01	43.91	0.0278
	gi|95103050	Malate dehydrogenase	家蚕 *B. mori*	6.51	67.96	0.0163
	gi|54609201	Ribosomal protein L7	家蚕 *B. mori*	11.35	31.47	0.0372
	gi|95102796	Ferritin isoform 1	家蚕 *B. mori*	7.28	26.25	0.0655
	gi|87248587	GTP-binding nuclear protein Ran	家蚕 *B. mori*	7.50	24.55	0.0657
	gi|284027826	Coatomer protein complex subunit delta	家蚕 *B. mori*	6.26	56.68	0.0197
	gi|87248527	Lysophospholipase	家蚕 *B. mori*	6.95	23.80	0.0364
	gi|87248151	Glutathione S-transferase omega 1	家蚕 *B. mori*	5.77	29.22	0.0354
	gi|110175064	Eukaryotic translation initiation factor 5	家蚕 *B. mori*	5.33	51.51	0.0216
	gi|111608121	Putative signal recognition particle 68 kDa protein	家蚕 *B. mori*	8.59	69.58	0.0184
	gi|218563475	Clathrin	家蚕 *B. mori*	5.34	193.58	0.0042
	gi|56418393	Hemolymph proteinase 6	烟草天蛾 *M. sexta*	5.42	39.84	0.0252
	gi|7272336	Ferritin	烟草天蛾 *M. sexta*	5.54	26.78	0.0388
	gi|354549503	Ribosomal protein P0	天蚕 *A. yamamai*	4.37	14.86	0.1286
	gi|87248137	RGS-GAIP interacting protein GIPC	家蚕 *B. mori*	5.95	35.44	0.0500
	gi|87248505	G protein pathway suppressor 1	家蚕 *B. mori*	6.64	54.74	0.0146
	gi|37359627	Ribosomal P0 protein	家蚕 *B. mori*	5.75	34.20	0.0380
	gi|111608125	Signal recognition particle receptor alpha subunit	家蚕 *B. mori*	7.80	67.79	0.0213
	gi|134436	RecName：Full = Alaserpin；AltName：Full = Serpin-1；Flags：Precursor	烟草天蛾 *M. sexta*	4.81	43.54	0.0357
	gi|157814222	Putative GTP-binding protein	*A. paukstadtorum*	5.50	31.89	0.0607
	gi|326632041	DRK	家蚕 *B. mori*	5.90	24.51	0.0330
	gi|56418417	Hemolymph proteinase 18	烟草天蛾 *M. sexta*	6.33	45.31	0.0376
	gi|54609223	Ribosomal protein L15	家蚕 *B. mori*	12.34	24.08	0.0490
	gi|87248225	Short-chain dehydrogenease/reductase	家蚕 *B. mori*	8.61	27.35	0.0472

AP28 和 AP44 鉴定蛋白质的覆盖率如图 3 所示。AP28 鉴定蛋白质在不同覆盖率分布的蛋白质数目为：0%～5%（18），5%～10%（20），10%～15%（11），15%～20%（6），20%～25%（3），25%～30%（1），30%～35%（3），35%～40%（1），40%～100%（1）；AP44 鉴定蛋白质在不同覆盖率分布的蛋白质数目为：0%～5%（36），5%～10%（13），10%～15%（9），15%～20%（2），20%～25%（1），25%～30%（1），30%～35%（3）。

2.3　质谱鉴定 AP28 和 AP44 蛋白质条带的蛋白质 COG 分析

由 AP44 和 AP28 蛋白质条带质谱鉴定获得的所有蛋白质 COG 功能共分为 16 类(图 4)。其中由 AP44 和 AP28 鉴定的共有蛋白质的功能种类包括：能量发生与转换、核苷酸运输与新陈代谢、糖类运输与新陈代谢、翻译/核糖体结构/生物起源、转译后修饰/蛋白质周转/伴随蛋白、无机离子运输与新陈代谢、次生代谢产物的生物合成/运输和分解、

括抗氧化活性、结合、催化活性、酶调节活性、分子传感器活性、蛋白结合转录因子活性、结构分子活性及转运蛋白活性；参与到20个生物学过程，包括生物调控、胞内组分发生和排列、细胞过程、死亡、发育过程、定位建立、免疫系统进程、定位、运动、新陈代谢过程、多组织进程、多细胞组织进程、生物过程负调控、生物过程正调控、生物过程调控、生殖、生殖进程、刺激应答、信号及病毒复制，其中与免疫系统相关蛋白 3 个（同时参与到刺激应答）、刺激应答的蛋白 19 个。

经统计，由 AP28 和 AP44 条带质谱鉴定到的可能参与免疫系统及刺激应答生物过程的蛋白质共有 29 个。AP28 中包括：天蚕 *A. yamamai* 热激蛋白、天蚕 *A. yamamai* 泛素样蛋白、家蚕 *B. mori* 泛素结合酶、烟草天蛾 *M. sexta* 保幼激素环氧水解酶、家蚕 *B. mori* 微管结合蛋白、印度柞蚕 *A. mylitta* 类溶菌酶、琥珀蚕 *A. assama* 溶菌酶原、家蚕 *B. mori* ADP-核糖基化因子、印度柞蚕 *A. mylitta* 防御蛋白、印度柞蚕 *A. mylitta* 类肽聚糖识别蛋白、蓖麻蚕 *S. cynthia ricini* 肽聚糖识别蛋白等 15 个；AP44 中包括：家蚕 *B. mori* DRK、家蚕 *B. mori* 酪氨酸 3-单加氧酶、家蚕 *B. mori* GIPC 蛋白、烟草天蛾 *M. sexta* 酚氧化酶原、柞蚕 *A. pernyi* 类免疫球蛋白等 10 个；二者共有家蚕 *B. mori* 热激蛋白 hsp21.4、家蚕 *B. mori* 酚氧化酶原、柞蚕 *A. pernyi* 抗菌肽等 4 个。

3 结论与讨论

微孢子虫 *N. bombycis* 在家蚕 *B. mori* 细胞内大量增殖，吸收消耗大量蚕体养分，从而使蚕体缺乏营养，同时裂殖体在繁殖过程中，会分泌蛋白酶，造成宿主细胞内容物溶解和液化，细胞产生空洞，引起蚕体生理功能障碍（龚舒聪等，2008）。同样，柞蚕微孢子虫自身缺乏营养合成系统，因此必须通过摄取柞蚕体内营养物质来满足自身增殖的需要，从而造成柞蚕营养物质缺乏，在这个过程中，是否也如家蚕微孢子虫一样会分泌一些蛋白质，破坏柞蚕细胞造成生理机能丧失等问题有待进一步证据证实。柞蚕微孢子虫侵染柞蚕引起柞蚕微孢子虫病，这个过程中影响病原物与宿主之间互作的因素很多，宿主自身免疫是昆虫防御的第一道防线。昆虫不具备高等动物完善的免疫系统，仍具有先天和获得性免疫的能力，主要包括细胞免疫和体液免疫（张双全等，1987；宁媛媛等，2009）。李士云等（1987）从正常柞蚕蛹血淋巴中分离出分子量为 40 kD 凝集素，屈贤铭等（1984，1985）及张双全等（1985）发现可诱导柞蚕产生多种抗菌物质，且抗菌活力随诱导源不同而有差异。家蚕、柞蚕均能诱导产生分子量约为 24 kD 的抗菌物质，柞蚕蛹经细菌诱导后凝集素活力明显提高（屈贤铭等，1984，1985）。本实验室前期研究发现，柞蚕 5 龄雌幼虫起蚕感染微孢子虫后 144 h 的血淋巴蛋白质中约 28 kD 和 44 kD 的 2 条蛋白条带信号增强，推测这 2 条蛋白质带可能与微孢子虫感染寄生有关（臧敏等，2012），本研究对这 2 条蛋白质带进行了质谱鉴定，共鉴定出 117 个不重复蛋白，其中 2 个样品共有蛋白质 12 个，AP28 独有蛋白质 52 个，AP44 独有蛋白质 53 个。经注释和功能分类分析发现，鉴定的蛋白质中可能参与柞蚕免疫系统及刺激应答等生物过程的蛋白质有 29 个，其中 AP28 中有 15 个蛋白质、AP44 中有 10 个蛋白质、2 个样品共有蛋白质 4 个。

昆虫受到病原物侵染时首先是利用包括肽聚糖识别蛋白、类免疫球蛋白等识别蛋白启动病原识别，进而启动下游的免疫反应（宁媛媛等，2009）。昆虫体液免疫系统是以抗菌肽、抗病毒因子、凝集素、溶菌酶、酚氧化物酶、蛋白酶抑制剂等，配合多功能的血细胞建立的一个开放完整的防御体系（李志强等，2003）。酚氧化酶原可被激活生成酚氧化酶，产生黑化反应，昆虫这种黑化反应是对外源入侵的最快的免疫应答（刘碧朗等，2011）。同时，Hemolin 是昆虫所特有的类免疫球蛋白，本身无直接的抗菌活性，但可以延缓昆虫的发病时间，同时也可调控昆虫体内酚氧化物酶的活性，影响黑化进程，在昆虫的免疫防御通路中具有重要的作用（李凤娟等，2012）。时连根等（2001）发现家蚕血细胞能吞噬囊包白僵菌分生孢子并黑化成囊包块，但只具有暂时阻害作用而不能完全阻止其分生孢子的萌发。

本研究的结果表明，微孢子虫感染后，柞蚕体内与免疫防御有关的蛋白质表达量增加，如肽聚糖识别蛋白、溶菌酶、防御蛋白、抗菌肽等。同时还鉴定到上调表达的类免疫球蛋白及酚氧化酶原、热激蛋白、泛素样蛋白、泛素结合酶 E2、ADP-核糖基化因子、保幼激素环氧水解酶等与柞蚕免疫及刺激应答相关的因子，鉴定到上调表达的热激蛋白（heat shock proteins，HSPs）、泛素-蛋白酶体途径有

关细胞周期、DNA 修复和免疫应激的蛋白质因子等，这些结果与昆虫免疫和刺激应答相关的蛋白质因子在其他昆虫微孢子虫感染应答的研究（包括蛋白质组学分析）结果相一致（张双全等，1987；汪方炜和鲁兴萌，2003；沈子琲等，2006；李明等，2008；李晓梅等，2009；颜彦等，2009；吴萍等，2011），提示本研究鉴定获得的 29 个参与柞蚕免疫系统及刺激应答生物过程的蛋白在微孢子虫侵染柞蚕初期可能发挥了作用。

特别值得讨论的是本研究中鉴定到感染后上调表达的罗奴霉素毛虫 *L. obliqua* 丝氨酸蛋白酶（putative serine protease-like protein 2）和柞蚕 *A. pernyi* 芳基贮存蛋白原（arylphorin precursor）。丝氨酸蛋白酶在昆虫体内主要介导消化、发育和先天免疫反应等生理过程，在酚氧化酶原的活化及黑色素沉积方面起着重要作用，在昆虫免疫应答过程中存在丝氨酸蛋白酶级联系统激活（陈建平等，2012）。在感染疟原虫后 24 h 的大劣按蚊 *Anopheles dirus* 血淋巴中分类并鉴定到丝氨酸蛋白酶（王英等，2008），家蚕感染微孢子虫后血淋巴中蛋白酶活性显著升高（龚舒聪等，2008），已有报道家蚕在受到微生物侵染时，丝氨酸蛋白酶参与了酚氧化酶信号传导通路（Satoh *et al.*，1999；刘碧朗等，2011），据此推测本研究中的结果显示微孢子虫侵染初期可能会激活柞蚕丝氨酸蛋白酶级联系统。芳基贮存蛋白（arylphorin）是昆虫变态过程中的贮存蛋白，Munn 和 Greville（1969）在红头丽蝇 *Calliphora erythrocephala* 中发现，作为蛹期和成虫期物质代谢、能量代谢的储存库，昆虫在幼虫期通过大量取食，在末龄幼虫的脂肪体大量合成贮存蛋白，后被释放到血淋巴中，在化蛹前被脂肪体重新选择吸收合成高密度蛋白结晶颗粒，再经部分或完全降解被释放到血淋巴中给不取食的变态期提供营养，对生长、变态发育及生殖等生理过程非常重要（马彩霞等，2002）。昆虫被寄生物寄生后，往往营养代谢发生异常，特别是血淋巴中芳基蛋白变化，始终保持较高水平，粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* 被一种寄生蜂 *Chelonus* spp. 寄生后，使应在 5 龄幼虫中表达的贮存蛋白提前表达，以利于寄生物自身的生长发育（Kunkel *et al.*，1990）。由此推测本研究中柞蚕 5 龄起蚕正常情况下的血淋巴中芳基贮存蛋白含量不应该很高，出现表达量升高现象可能与柞蚕微孢子虫通过调节某些途径作用于宿主蛋白质代谢过程有关，造成柞蚕脂肪体组织功能异常，从而出现提早表达现象，从而有利于柞蚕微孢子虫的生长发育，造成柞蚕营养缺乏而发病。

柞蚕微孢子虫侵染并引起病害是一个相对复杂的系统侵染过程，涉及到柞蚕免疫系统诸多免疫因子的调控，同时推测微孢子虫在这个过程中会分泌某些酶类或蛋白质从而影响柞蚕的蛋白质消化及吸收等生理过程。利用一维电泳结合质谱分析技术来研究柞蚕蛋白质组学，特别是微孢子虫侵染过程中柞蚕蛋白质组学研究，可以用来初步鉴定与柞蚕免疫及刺激应答等相关的蛋白质，特别是一些低丰度蛋白质，今后深入研究这些相关蛋白质在微孢子虫感染应答中的功能，对揭示柞蚕抵抗微孢子虫的免疫应答机制有重要意义。

参考文献（References）

Chen HS, Lu XM, 2010. Changes of midgut proteins of silkworm, *Bombyx mori* infected with *Nosema bombycis*. *Bulletin of Sericulture*, 41(4): 5－8.［陈洪松，鲁兴萌，2010. 微粒子病家蚕中肠组织蛋白质的变化. 蚕桑通报，41(4)：5－8］

Chen JP, Zhao P, Dong ZM, Zhang Y, Shi H, Xia QY, 2012. An analysis on clip serine protease family genes involved in innate immunity of *Bombyx mori*. *Science of Sericulture*, 38(2): 241－248.［陈建平，赵萍，董照明，张艳，石虎，夏庆友，2012. 参与家蚕免疫反应的 clip 丝氨酸蛋白酶家族基因分析. 蚕业科学，38(2)：241－248］

Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M, Robles M, 2005. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21(18): 3674－3676.

Ding J, Su GM, Wen JZ, 1992. Study on the perbrine pathogens in Chinese tussah silkworm, *Antheraea pernyi* Guerin-Meneville. *Science of Sericulture*, 18(2): 88－92.［丁杰，宿桂梅，问锦曾，1992. 中国柞蚕微粒子病病原的研究. 蚕业科学，18(2)：88－92］

Dussaubat C, Brunet JL, Higes M, Colbourne JK, Lopez J, Choi JH, Martín-Hernández R, Botías C, Cousin M, McDonnell C, Bonnet M, Belzunces LP, Moritz RF, Le Conte Y, Alaux C, 2012. Gut pathology and response to the microsporidium *Nosema ceranae* in the honey bee *Apis mellifera*. *PLoS ONE*, 7(5): e37017.

Eugene VK, 2002. The clusters of orthologous groups (COGs) database: phylogenetic classification of proteins from complete genomes. In: McEntyre J, Ostell J eds. The NCBI Handbook. National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21090/.

Gong SC, Sun YT, Sheng SJ, Zhang B, Lu XM, 2008. Effect of different density of pebrine spore (*Nosema bombycis*) infection on protease activity in silkworm midgut and blood. *Bulletin of Sericulture*, 39(3): 11－16.［龚舒聪，孙远挺，盛思佳，章犇，鲁兴萌，2008. 家蚕微孢子虫感染家蚕对其中肠和血液蛋白酶

活性影响. 蚕桑通报, 39(3): 11－16]

Jiang YR, Deng ZH, Wang BY, Duan YX, Qin L, 2011. Study on the method of separation and purification in *Nosema pernyi*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(2): 452－456. [姜义仁, 邓真华, 王伯阳, 段玉玺, 秦利, 2011. 柞蚕微孢子虫孢子分离纯化方法. 应用昆虫学报, 48(2): 452－456]

Kunkel JG, Grossniklaus-Buergin C, Karpells ST, Lanzrein B, 1990. Arylphorin of *Trichoplusia ni*: characterization and parasite-induced precocious increase in titer. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 13 (1－2): 117－125.

Li FJ, Li YJ, Li WL, 2012. Research of hemolin－an insect immune defense molecule. *Life Science Research*, 16(1): 90－94. [李凤娟, 李亚洁, 李文利, 2012. 昆虫免疫防御分子 Hemolin 的研究进展. 生命科学研究, 16(1): 90－94]

Li M, Miao ZH, Ding J, 2008. Study progress of proteasome and its inhibitor. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 24(5): 565－569. [李明, 缪泽鸿, 丁健, 2008. 蛋白酶体及其抑制剂的研究进展. 中国药理学通报, 24(5): 565－569]

Li SY, Wu KZ, Zhang SQ, Qiu XZ, Qu XM, 1987. Isolation and characterization of lectin in hemolymph from pupae of the Chinese oak silkworm *Antheraea pernyi*. *Acta Entomologica Sinica*, 30(1): 1－7. [李士云, 吴克佐, 张双全, 邱雪贞, 屈贤铭, 1987. 柞蚕蛹血淋巴中凝集素的分离鉴定. 昆虫学报, 30(1): 1－7]

Li XM, Ren ZZ, Chen Y, Zhong GH, 2009. Recent advances in ubiquitin gene and function of insects. *Biotechnology Bulletin*, (Suppl.): 62－66. [李晓梅, 任珍珍, 陈永, 钟国华, 2009. 昆虫泛素基因和功能研究进展. 生物技术通报, (增刊): 62－66]

Li ZQ, Chen GS, Wang MX, Wang GX, 2003. Molecular biology of insect humoral immunity. *Chemistry of Life*, 23(5): 348－351. [李志强, 陈国生, 王茂先, 王国秀, 2003. 昆虫体液免疫的分子生物学. 生命的化学, 23(5): 348－351]

Liu BL, Li YX, Qi XW, Xiang ZH, He NJ, 2011. Molecular cloning and expression analysis of serine protease gene *BmHP*21 in silkworm, *Bombyx mori*. *Science of Sericulture*, 37(3): 419－424. [刘碧朗, 李玉欣, 亓希武, 向仲怀, 何宁佳, 2011. 家蚕丝氨酸蛋白酶基因 *BmHP*21 的克隆及表达分析. 蚕业科学, 37(3): 419－424]

Ma CX, Liu HX, Sha ZL, Li YP, 2002. Progress in research on insect storage proteins. *Entomological Knowledge*, 39(6): 416－420. [马彩霞, 刘惠霞, 沙忠利, 李怡萍, 2002. 昆虫体内储存蛋白的研究进展. 昆虫知识, 39(6): 416－420]

Munn EA, Greville GD, 1969. The soluble proteins of developing: *Calliphora erythrocephala*, particularly calliphorin, and similar proteins in other insects. *Journal of Insect Physiology*, 15(10): 1935－1950.

Ning YY, You MS, Wang CS, 2009. Advance in the mechanisms of insect immune recognition and pathogen immune escape. *Acta Entomologica Sinica*, 52(5): 567－575. [宁媛媛, 尤民生, 王成树, 2009. 昆虫免疫识别与病原物免疫逃避机理研究进展. 昆虫学报, 52(2): 567－575]

Perkins DN, Pappin DJC, Creasy DM, Cottrell JS, 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, 20(18): 3551－3567.

Qin L, 2003. Chinese Tussah. China Scientific & Cultural Press, Beijing. 1, 347－351. [秦利, 2003. 中国柞蚕学. 北京: 中国科学文化出版社. 1, 347－351]

Qu XM, Lee SY, Wu KZ, Qiu XZ, Lou YC, Liu XY, Qi GR, 1985. Kinetics of the inducible lysozyme, antibacterial peptides and lectin from the pupae of oak silkworm *Antheraea pernyi* and silkworm *Bombyx mori* by injecting *Escherichia coli* D_{31} or poly I: C. *Acta Entomologica Sinica*, 28(1): 1－7. [屈贤铭, 李士云, 吴克佐, 邱雪贞, 娄艳春, 刘新垣, 祁国荣, 1985. 大肠杆菌及聚肌胞核苷酸对柞蚕、家蚕蛹诱导产生溶菌酶、抗菌肽及凝集素的动力学. 昆虫学报, 28(1): 1－7]

Qu XM, Qi GR, Huang ZR, 1984. Comparative studies on antibacterial substances of silkworms after *Escherichia coli* injection and ultrasonic treatment. *Acta Entomologica Sinica*, 27(3): 275－279. [屈贤铭, 祁国荣, 黄自然, 1984. 注射大肠杆菌或超声波诱导家蚕及蓖麻蚕产生抗菌物质的比较研究. 昆虫学报, 27(3): 275－279]

Satoh D, Horii A, Ochiai M, Ashida M, 1999. Prophenoloxidase-activating enzyme of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.*, 274(11): 7441－7453.

Shen ZJ, Xu XS, Li D, 2006. Ubiquitin-proteasome and its inhibitor. *Modern Oncology*, 14(11): 1454－1457. [沈子珒, 许啸声, 李稻, 2006. 泛素-蛋白酶体及其抑制剂. 现代肿瘤医学, 14(11): 1454－1457]

Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M, 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.*, 68(5): 850－858.

Shi LG, Zhong BX, Xu JL, 2001. Studies on the defense mechanism of hemolymph in the silkworm *Bombyx mori* to *Beauveria bassiana*. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 9(4): 383－386. [时连根, 钟伯雄, 徐俊良, 2001. 家蚕血淋巴对病原白僵菌的防御机理. 农业生物技术学报, 9(4): 383－386]

Wang FW, Lu XM, 2003. Microsporidiosis in insects. *Entomological Knowledge*, 40(1): 5－8. [汪方炜, 鲁兴萌, 2003. 昆虫的微孢子虫病. 昆虫知识, 40(1): 5－8]

Wang Y, Li YZ, Wang BY, Jiang YR, Yang RS, Fan H, Qin L, 2011. 2D-PAGE image analysis of proteins from developing embryos of *Antheraea pernyi*. *Science of Sericulture*, 37(4): 658－665. [王勇, 李彦卓, 王伯阳, 姜义仁, 杨瑞生, 樊虹, 秦利, 2011. 柞蚕胚胎发育期蛋白质的 2D-PAGE 图谱分析. 蚕业科学, 37(4): 658－665]

Wang Y, Zhang J, Zhang XL, Zhou TL, Duan JH, Xu WY, Huang FS, 2008. Separation and identification of serine protease in hemolymph of *Anopheles dirus*. *Journal of Pathogen Biology*, 3(3): 203－205. [王英, 张健, 张锡林, 周桃莉, 段建华, 徐文岳, 黄复生, 2008. 大劣按蚊血淋巴中丝氨酸蛋白酶的分离与鉴定. 中国病原生物学杂志, 3(3): 203－205]

Wu P, Liu T, Qin GX, Guo XJ, 2011. Analysis of responsive genes in the midgut of silkworm infected with *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus. *Scientia Agricultura Sinica*, 44(13): 2814－

2822.［吴萍，刘挺，覃光星，郭锡杰，2011. 家蚕中肠组织感染质型多角体病毒的应答基因分析. 中国农业科学，44(13)：2814 –2822］

Yan Y，Han HY，Huang B，2009. Progress of study on heat shock proteins of parasites. *Biotechnology Bulletin*，(2)：29 –33.［颜彦，韩红玉，黄兵，2009. 寄生虫热激蛋白的研究进展. 生物技术通报，(2)：29 –33］

Ye J，Fang L，Zheng H，Zhang Y，Chen J，Zhang Z，Wang J，Li S，Li R，Bolund L，Wang J，2006. WEGO：a web tool for plotting GO annotations. *Nucleic Acids Res.*，34 (Web Server issue)：W293 –W297.

Zang M，Qin P，Wang Y，Zhong L，Qin L，Wang ZD，Jiang YR，2012. Variation and difference analysis on content and composition of proteins in haemolymph of the fifth instar *Antheraea pernyi* larvae infected by *Nosema pernyi*. *Science of Sericulture*，38(1)：99 –103.［臧敏，秦萍，王勇，钟亮，秦利，王振东，姜义仁，2012. 柞蚕微孢子虫侵染后柞蚕5龄雌雄个体血淋巴蛋白质含量和组成的变化及差异分析. 蚕业科学，38(1)：99 –103］

Zhang SQ，Qu XM，Qi ZW，1985. The effect of different immunizing agents on the production of antibacterial substances in the hemolymph and sexual gland of Chinese oak silk moth (*Antheraea pernyi*). *Chinese Biochemical Journal*，4(1)：49 –56.［张双全，屈贤铭，戚正武，1985. 不同诱导源对柞蚕蛹血淋巴及生殖腺中抗菌物质产生的影响. 生物化学杂志，1(4)：49 –56］

Zhang SQ，Qu XM，Qi ZW，1987. The application of insect antimicrobial peptides and innate immune response of insects. *Chinese Biochemical Journal*，3(1)：11 –18.［张双全，屈贤铭，戚正武，1987. 昆虫免疫应答及抗菌肽应用前景. 生物化学杂志，3(1)：11 –18］

Zhou T，Yao J，Wang Q，Wang FZ，2004. Changes in content of hemolymph protein in the honeybee (*Apis mellifera* L.) workers infected by *Nosema apis* and *Varroa destructor* respectively. *Acta Entomologica Sinica*，47(4)：530 –533.［周婷，姚军，王强，王风忠，2004. 微孢子虫和狄斯瓦螨分别侵染后的意蜂血淋巴蛋白质含量变化. 昆虫学报，47(4)：530 –533］

（责任编辑：赵利辉）